

Afd. Koolhydraat- en Vetchemie

RAPPORT 83.48

1983-06-20

Pr.nr. 505.3000

Onderwerp: Bepaling van glucosinolaat
(isothiocyanaat (ITC) + vinyl-
thio-oxazolidon (VTO)).

Tabellen: 12.

Bijlagen: 6.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (2x), direktie VKA, afd.
Koolhydraat- en Vetchemie (4x), afd. Normalisatie
(Humme), Projektbeheer, Projektleider (Muuse).

Project: Ontwikkeling en verbetering van onderzoekmethoden voor oliën, vetten, vette produkten en oliezanen

Onderwerp: Bepaling van glucosinolaat (isothiocyanaat (ITC) + vinyl-thio-oxazolidon (VTO)

Tabellen: 12.

Bijlagen: 6.

Doel:

Het verkrijgen van een bepalingmethode voor glucosinolaat in dubbelnul variëteiten van kool/raapzaad (laag glucosinolaat en erucazuurgethalte). Tevens kan deze methode dienen als bepalingmethode van glucosinolaat in kool/raapachroot t.b.v. denaturatie regeling van melkpoeder.

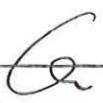
Samenvatting: Het glucosinolaatgethalte kan berekend worden uit het ITC en VTO gethalte.


Voor het bepalen hiervan bestaat een officieel ISO voorschrift (G.L.C. en spectrofotometrisch).

Tevens is er een HPLC-methode ter bepaling van VTO. De genoemde methoden werden getoetst op de mogelijkheid om glucosinolaat t.b.v. dubbelnul variëteiten en voor de denaturatie van melkpoeders te bepalen. Verder werd onderzocht of de ITC en VTO methoden gecombineerd konden worden en of glucosinolaat via het glucose gethalte bepaald kan worden.

Conclusie:

Zowel de interne ITC (GIC) en VTO (HPLC) methode zijn geschikt voor de bepaling van glucosinolaat in koolraapzaad t.b.v. dubbelnul variëteit en in koolraapzaadschroot t.b.v. de denaturatie van melkpoeders. De interne VTO (HPLC) methode zal voor wat betreft absolute gehalten nog verder onderzocht moeten worden. De spectrofotometrische VTO bepaling is alleen te gebruiken voor de bepaling van glucosinolaat in kool/raapzaadschroot t.b.v. de denaturatie van melkpoeders. Zowel de gecombineerde methode als glucosinolaatbepaling via glucose blijken (nog) niet geschikt te zijn.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse 

Medewerkers/Samenstellers: M.L. Essers, T.H.C. Wolters, L.M.H. Frijs 

Projectleider: drs B.G. Muuse

Samenvatting inhoud

- 1 Inleiding
- 2 De bepaling van het VTO-gehalte
 - 2.1 Bepaling VTO en ITC gehalte m.b.v. HPLC
 - 2.2 Spectrofotometrische bepaling van het VTO gehalte
 - 2.3 Bepaling VTO gehalte m.b.v. G.C.
- 3 Vergelijking van de HPLC methode met de spectrofotometrische methode
- 4 De bepaling van het ITC gehalte m.b.v. G.C.
- 5 Gecombineerd ITC en VTO bepaling m.b.v. GLC en HPLC
- 6 Bepaling glucosinolaatgehalte via glucose
- 7 Conclusie.

Overzicht van de bijlagen en tabellen.

Bijlagen:

1. The determination of vinyloxazolidine-thione. Laboratory of the Government Chemists.
2. Intern analysevoorschrift 71 D 142. Bepaling VTO m.b.v. HPLC.
3. Determination of isothiocyanates and vinylthio-oxazolidone ISO/DIS 5504.
4. Intern analysevoorschrift 71 D 143 Spectrofotometrische bepaling van VTO.
5. Kolomkeuze voor bepaling van ITC m.b.v. G.C.
6. Intern analysevoorschrift 71 D 141. Bepaling van ITC m.b.v. G.C.

Tabellen

1. Vergelijking spectrofotometrische VTO bepaling met de HPLC methode.
2. In etherextracten van spectrofotometrische bepaling zowel spectrofotometrisch als met HPLC VTO bepaald.
3. Wordt ITC bij spectrofotometrische VTO bepaling meebepaald?
4. Invloed berekening op ITC gehalte.
5. Invloed incubatietemperatuur op het ITC-gehalte.
6. Kolomkeuze voor ITC bepaling m.b.v. G.C.
7. Bepaling ITC m.b.v. G.C.
8. Bepaling ITC m.b.v. G.C.
9. Namen en land van herkomst van enige op ITC en VTO onderzochte kool/raapzaden
10. Vergelijking ITC methode (G.C.) met gecombineerde methode.
11. Vergelijking VTO-methode (HPLC) met gecombineerde methode.
12. Bepaling glucosinolaat via het glucosegehalte.

1. Inleiding

Het doel van dit onderzoek was een bepalingmethode te verkrijgen voor glucosinolaat in kool/raapzaad t.b.v. dubbelnul variëteiten d.w.z. laag erucazuur en laag glucosinolaatgehalte.

Tevens bestaat de behoefte om glucosinolaten te bepalen in kool/raap-schroot t.b.v. denaturatie van melkpoeder en veevoeders.

Bepaling van het glucosinolaatgehalte in kool/raapzaden is van belang omdat kool/raapzaad of het schroot daarvan verwerkt wordt in veevoeders. Een te hoog gehalte aan glucosinolaat veroorzaakt maag- en darmstoringen bij jonge dieren (b.v. baby biggen).

Bij de denaturatie van melkpoeder met kool/raapschroot dient het gehalte aan glucosinolaat hoog te zijn ($ITC + VTO > 1,0\%$ of dubbele hoeveelheid koolraapzaadschroot met een gehalte van $> 0,5\%$).

Deze gedenatureerde melkpoeder mag namelijk voor jonge dieren niet gebruikt worden.

Er zijn verschillende methoden ter bepaling van het glucosinolaatgehalte. Het principe berust op een enzymatische hydrolyse van het glucosinolaat in allyl-, butenyl-, pentenyl isothio-cyanaten (ITC), vinyl-thio-oxazolidon (VTO) en glucose waarbij tevens zwavelzuur vrijkomt. Het vrijgekomen ITC en VTO kan nu bepaald worden en teruggerekend naar glucosinolaat m.b.v. factoren.

In dit onderzoek werden de bestaande analysemethoden getoetst op de mogelijkheid om lage gehalten te bepalen. Ook werden de verschillende methoden vergeleken en werd onderzocht of analysemethoden voor ITC en VTO samengevoegd konden worden.

Tevens werd onderzocht of glucosinolaat via het vrijgekomen glucose bepaald kan worden.

2. De bepaling van het VTO-gehalte.

Deze bepaling kan met drie methoden uitgevoerd worden namelijk m.b.v. HPLC, spectrofotometrie en G.C.

2.1 Bepaling VTO en ITC-gehalte m.b.v. HPLC

Van deze bepalingmethode is er een voorschrift van de laboratory of the Government chemist (zie bijlage 1). De laagst aantoonbare hoeveelheid is 200 mg/kg. Dit voorschrift werd na enkele wijzigingen overgenomen als intern RIKILT-voorschrift (zie bijlage 2).

De laagst aantoonbare hoeveelheid is daarbij 10 mg/kg en dus bruikbaar voor het bepalen van dubbelnul variëteiten met max. 200 mg/kg glucosinolaat voor wat betreft het VTO gehalte.

Tevens werd de mogelijkheid onderzocht of ITC met behulp van HPLC bepaald kon worden.

Hiertoe werd een ITC standaard ingespoten onder de condities van de VTO bepaling. ITC heeft bij eenzelfde golflengte als VTO zijn piekmaximum. ITC elueert echter gelijk met het oplosmiddel, zodat de bepaling van ITC m.b.v. HPLC niet gelijktijdig met VTO mogelijk is.

2.2 Spectrofotometrische bepaling van het VTO-gehalte.

Deze officiële methode staat beschreven in een ISO voorschrift (zie bijlage 3). Een vertaalde versie is weergegeven in een intern RIKILT voorschrift (zie bijlage 4). De minimaal aantoonbare hoeveelheid is ca. 500 mg/kg en dus niet geschikt voor dubbelnul variëteiten. Deze methode is wel geschikt voor de bepaling van VTO in kool/raapschroot t.b.v. de denaturatie van melkpoeder (min. 0,5% of 1,0% ITC + VTO).

Opmerkingen:

- Bij de meting is gebleken dat VTO in oplossing lichtgevoelig is. De kuvetten dienen dus niet in de lichtweg te blijven staan.
- In het ISO voorschrift wordt gebruik gemaakt van een factor 8,20 bij de berekening. Bij controle van deze factor is gebleken dat los van de molaire extinctie coefficient, verliezen tijdens de bepaling een invloed hebben op deze factor waardoor dus een empirische factor verkregen wordt.

Bij rechtstreekse meting van pure VTO in ether werd namelijk een factor van 7,29 gevonden. Indien echter VTO opgelost in water volgens voorschrift tweemaal met ether werd uitgeschud was deze factor gemiddeld 8,28. Indien een standaard geheel volgens voorschrift werd behandeld werd voor de factor 33,7 en 24,7 gevonden hetgeen een recovery van 24% en 33% betekent. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de standaardadditiemethode bij de spectrofotometrische bepaling niet gebruikt kan worden. De oorzaak ligt waarschijnlijk bij de slechte oplosbaarheid van de standaarden.

2.3 Bepaling VTO gehalte m.b.v. G.C.

Deze methode staat beschreven in het voorschrift van de laboratory of the Government chemist (zie bijlage 1).

De in dit voorschrift beschreven kolom 5% OV 17 werd niet gebruikt. Er werd gebruik gemaakt van een kolom 3% OV 17 (1,5 m). Naar verwachting zou dit een betere scheiding moeten geven. Het VTO werd bij deze kolom echter niet voldoende gescheiden van het oplosmiddel. Tevens werd er veel storing ondervonden van pieken uit het oplosmiddel. Naar aanleiding van deze slechte scheiding werd een andere kolom getest voor de bepaling van het VTO namelijk een silar 5 CP (3 m). Hier was ook geen scheiding tussen het oplosmiddel en het VTO.

De bepaling van het VTO m.b.v. G.C. is dus met de door ons onderzochte kolomtypen niet mogelijk.

3. Vergelijking van de HPLC methode met de spectrofotometrische VTO methode.

Daar de spectrofotometrische methode de internationaal officiële methode is werd de HPLC methode hiermee vergeleken (zie tabel 1). Bij gehalten van $\pm 0,9\%$ VTO werd bij de fotometrische bepaling gemiddeld $0,03\%$ minder gevonden. Om de twee methoden goed te kunnen vergelijken werd het etherextract op beide manieren gemeten (fotometrisch en HPLC) tegen de standaard als referentie.

De resultaten staan vermeld in tabel 2. De HPLC methode geeft nu beduidend lagere gehalten $\pm 10\%$. Het vermoeden bestond dat bij de spectrofotometrische bepaling misschien ITC werd meebepaald. Om dit te controleren werd aan een monster butylisothiocyanaat toegevoegd en verder volgens voorschrift geanalyseerd. Voor de resultaten zie tabel 3.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat ITC niet meebepaald wordt.

De HPLC methode zal dus nog verder ontwikkeld moeten worden om deze aan te laten sluiten bij de officiële fotometrische methode.

4. De bepaling van het ITC gehalte m.b.v. G.C.

De officiële methode staat beschreven in een ISO voorschrift (zie bijlage 3).

Alvorens dit voorschrift te vertalen en weer te geven in een intern voorschrift werden de volgende proeven uitgevoerd:

- blanco enzym: bij de bepaling van ITC in het gebruikte enzym (uit wit mosterdzaad) werd geen ITC aangetoond
- interne standaard: onderzocht werd of er in een monster ook stoffen voorkwamen die gelijk elueren met de interne standaard (butyl-iso-thio-cyanaat). Dit bleek niet het geval te zijn
- "stoor" pieken: Na de ITC's elueren nog enkele andere stoffen. Deze bleken voornamelijk van het oplosmiddel afkomstig te zijn.
Om onnodig tijdverlies te voorkomen dient na elke analyse de kolom uitgestookt te worden, door de kolom b.v. 10 min. op 200°C te brengen. De injectie en detectie temperatuur dienen hieraan aangepast te worden
- berekening van ITC gehalte: de berekening kan zowel via molmassa als met molmassa en theoretische respons berekend worden. In tabel 4 staan enige resultaten waarbij de ITC gehalten op beide manieren berekend zijn.

Hieruit blijkt dat het gehalte aan ITC op beide manieren berekend weinig verschil oplevert. Gekozen werd voor de berekening van ITC m.b.v. molmassa en responsfactoren (berekening b).

- incubatie temperatuur: onderzocht werd of een hogere incubatie temperatuur een hoger gehalte zou geven. Hierbij werd in een monster bij 22°C en 30°C ITC bepaald (zie tabel 5). De incubatie bij 30°C gaf een iets lagere uitkomst. Een hogere temperatuur geeft dus geen hogere gehalten.
- voorbewerking: omdat de voorbewerking van de monsters tijdrovend is, werd een monster schroot met en zonder ontvetten geanalyseerd.
Resultaat: ontvette monster 0,309% en 0,298% ITC v.v.d.s.

niet ontvette monsters: 0,307% en 0,304% ITC v.v.d.s.

Het ontvetten van schroot is dus niet persé noodzakelijk voor de ITC bepaling echter het malen van een niet ontvet monster is aanzienlijk moeilijker dan een wel ontvet monster. Tevens wordt het gehalte vaak uitgedrukt in v.v.d.s. waardoor steeds een vetbepaling van het al dan niet ontvette monster nodig is.

- kolomkeuze: in het voorschrift staat één type kolom vermeld namelijk een 10% DEGS (komt overeen met silar 9 CP).

Er werd een proef uitgevoerd door acht monsters in te spuiten op verschillende kolommen met een iets andere polariteit. De kolommen waren:

gepakte silar 5 CP

gepakte silar 9 CP

Capillaire CP max. 57 CP.

De resultaten staan vermeld in tabel 6.

Indien mogelijk heeft de capillaire kolom de voorkeur vanwege een betere scheiding en een korte analysetijd (\pm 10-15 min.; gepakte kolom \pm 60 min). Wanneer een capillaire kolom niet mogelijk is kan het best een gepakte silar 9 CP kolom gebruikt worden (betere scheiding t.o.v. 5 CP). Zie chromatogrammen in bijlage 5.

Het ISO voorschrift werd een weinig aangepast en opgenomen als intern voorschrift (zie bijlage 6). Met behulp van dit voorschrift werden enige monsters in duplo geanalyseerd (zie tabel 7 en 8). De laagst aantoonbare hoeveelheid is 20 mg/kg. Deze methode is dus geschikt voor de bepaling van dubbelnul variëteiten en voor de bepaling van glucosinolaten in kool/raapschroot t.b.v. denaturatie melkpoeder.

5. Gecombineerde ITC en VTO bepaling.

Onderzocht werd of ITC en VTO bepaald konden worden d.m.v. maar één extractie. Hiertoe werd voor de gecombineerde methode het intern voorschrift voor VTO gevolgd met de volgende wijziging:

- chloroform werd toegevoegd voor in plaats van na de incubatie. Aan de chloroform werd de interne standaard in dezelfde concentratie toegevoegd als bij het ITC voorschrift.

Er werden 16 monsters (zie tabel 9) geanalyseerd op ITC en VTO m.b.v. de interne voorschriften en m.b.v. de gecombineerde methode. De resultaten voor de ITC bepaling staan vermeld in tabel 10, voor de VTO bepaling in tabel 11.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat de gecombineerde methode niet gebruikt kan worden voor de ITC en VTO bepaling.

Voor ITC was de range 0,04%-0,55%. De aangepaste methode gaf gemiddeld 0,1% (absoluut) lagere gehalten.

Voor VTO was de range 0,02%-0,96%. De aangepaste methode gaf gemiddeld 0,1% (absoluut) lagere gehalten.

6. Bepaling glucosinolaatgehalte via glucose.

Glucosinolaat wordt door het enzym mirosinase (uit wit mosterdzaad) gesplitst in ITC, VTO, glucose en zwavelzuur. Onderzocht werd of via een enzymatische glucosebepaling het glucosinolaatgehalte bepaald kon worden. Hiervoor werden de monsters (tabel 9) geïncubeerd volgens het intern VTO voorschrift. Het vrijgekomen glucose werd bepaald door de monsters zowel met als zonder enzym toevoeging te analyseren op glucose. De resultaten staan vermeld in tabel 12.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat glucosinolaat op deze manier niet via glucose kan worden bepaald. Er werd tevens nog onderzocht of de pH bij de incubatie invloed had op het resultaat. De blanco werd nu bij een lagere pH bepaald. Het is mogelijk dat er in het monster wit mosterdzaad van nature aanwezig is waardoor de blanco bepaling veel te hoge waarden geeft. Dit gaf echter wel andere resultaten maar had geen beter resultaat tot gevolg (zie tabel 12).

7. Conclusie.

De interne bepalingmethoden voor ITC (GLC) en VTO (HPLC) zijn geschikt voor de bepaling van glucosinolaat in kool/raapzaad t.b.v. dubbelnul variëteit en de denaturatie melkpoeders. De interne VTO-HPLC methode zal echter nog verder onderzocht moeten worden voor wat betreft absolute gehalten. De spectrofotometrische bepaling van VTO is te gebruiken voor de VTO bepaling in kool/raapschroot ten behoeve van denaturatie melkpoeders.

De gecombineerde methode voor ITC en VTO alsmede glucosinolaatbepaling via glucose geven (nog) geen goede resultaten.

Tabel 1

Vergelijking spectrofotometrische VTO bepaling met de HPLC methode

RIKILT nr.	% VTO vetvrije droge stof	
	HPLC	spectrofotometrisch
19537	0,947/0,952	0,912-0,902
19823	0,955-0,960	0,908-0,875
19842	0,866-0,897	0,829-0,828
19978	0,864-0,876	0,854-0,846
20202	0,889-0,882	0,836-0,827
20380	0,947-0,952	0,896-0,903
20468	0,933-0,931	0,944-0,930
20487	0,930-0,922	0,901-0,903
20517	<u>0,906-0,905</u>	<u>0,923-0,913</u>
gemiddeld:	0,917	0,885 verschil: 0,032%

Tabel 2

In etherextracten van spectrofotometrische bepaling zowel spectrofo-
tometrisch als met HPLC VTO bepaald, beide t.o.v. een standaardaf-
wijking

RIKILT nr.	% VTO vetvrije droge stof	
	spectrofotometrisch	etherextract ingespoten op HPLC
25131	0,787	0,728
	0,816	0,742
25154	0,412	0,372
	0,419	0,370
25163	0,709	0,656
	<u>0,702</u>	<u>0,636</u>
gemiddeld:	0,641	0,584 verschil: 0,057%

Tabel 3

Wordt ITC bij spectrofotometrische VTO bepaling meebepaald?

RIKILT nr.	% VTO in vetvrije stof	
	zonder toevoeging	met toevoeging
	butylisothiocyanaat	butylisothiocyanaat
24227	{ 0,864	0,853
	{ 0,856	0,844

ITC toevoeging had dus geen effect.

Tabel 4 Invloed berekening op ITC gehalte

Resultaten 12 rassen in enkelvoud.

Ras naam		Erucazuur %	allyl ITC %	butenyl ITC %	Pentenyl ITC %	tot. ITC %	tot Gluco- sinolaat %
Liragold	a.	51,0	0,001	0,340	0,077	0,418	1,271
	b.		0,001	0,346	0,070	0,417	1,268
Emerald	a.	50,2	0,001	0,380	0,042	0,423	1,291
	b.		0,001	0,387	0,038	0,426	1,300
Velox	a.	43,0	0,001	0,300	0,083	0,384	1,167
	b.		0,002	0,305	0,075	0,382	1,161
Akela	a.	41,7	0,001	0,203	0,074	0,278	0,843
	b.		0,001	0,206	0,067	0,274	0,831
Windal	a.	47,8	0,002	0,303	0,076	0,381	1,160
	b.		0,003	0,308	0,068	0,379	1,154
Blako	a.	42,7	0,002	0,323	0,096	0,421	1,277
	b.		0,003	0,329	0,087	0,419	1,271
Jet Neuf	a.	0,5	0,001	0,398	0,111	0,510	1,548
	b.		0,002	0,405	0,101	0,508	1,542
Primor	a.	0,2	0,001	0,390	0,049	0,440	1,345
	b.		0,001	0,397	0,044	0,442	1,351
Quinta	a.	0,3	0,001	0,239	0,054	0,294	0,897
	b.		0,001	0,243	0,049	0,293	0,894
Coriander	a.	1,6	0,001	0,290	0,051	0,342	1,042
	b.		0,001	0,295	0,046	0,342	1,042
Expander	a.	2,8	0	0,240	0,003	0,243	0,749
	b.		0	0,244	0,003	0,247	0,761
Orma	a.	47,6	0	0,415	0,086	0,501	1,525
	b.		0	0,423	0,078	0,501	1,525

berekening a
$$\frac{me}{115,19 \times se \times m} (99,15 \times Sa + 113,18 \times Sb + 127,2 \times 0,9 \times Sp) 0,1$$

berekening b
$$\frac{me}{Se \times m} (1,2 \times Sa + Sb + 0,9 \times Sp) 0,1$$

Resultaten in % op vet vrije stof

a. is berekening zonder rekening te houden met responsfactoren

b. is berekend rekening houdend met responsfactoren.

Tabel 5

Invloed incubatietemperatuur op het ITC gehalte

Incubatie 22°C

analist	Allyl		Butenyl		Pentenyl		totaal ITC	
	A	B	A	B	A	B	A	B
	0,001	0,001	0,239	0,244	0,055	0,056	0,295	0,301
	0,001	0,001	0,230	0,236	0,054	0,050	0,285	0,287
\bar{x}	0,001	0,001	0,235	0,240	0,055	0,053	0,290	0,294

Incubatie 30°C

analist	Allyl		Butenyl		Pentenyl		totaal ITC	
	A	B	A	B	A	B	A	B
	0,001	0,001	0,228	0,212	0,048	0,043	0,277	0,256
	0,001	0,001	0,225	0,232	0,047	0,048	0,273	0,281
\bar{x}	0,001	0,001	0,227	0,222	0,048	0,046	0,276	0,269

Resultaten in % vetvrije droge stof

Incubatie bij hogere temperatuur gaf dus geen hogere gehalten.

Tabel 6

Kolomkeuze voor ITC bepaling m.b.v. GC

% ITC in vetvrije droge stof

monster nummer	gepakte kolom		capillair	
	silar 5 CP	silar 9 CP	CP	wax 57 CB
1	0,413	0,406		0,397
2	0,402	0,393		0,390
3	0,397	0,391		0,395
4	0,383	0,374		0,369
5	0,295	0,288		0,291
6	0,374	0,379		0,379
7	0,291	0,285		0,283
8	0,392	0,384		0,383

Voor chromatogrammen zie bijlage 5.

Tabel 7

Bepaling ITC m.b.v. GC

Rassen kool/raapzaad voor ISO thiocynaat

Naam uitkomst in %	Allyl 1)	Butenyl 1)	Pentenyl 1)	tot. ITC 1)	erucazuur 2)	vocht 3)	olie 3)
Akela	0,001 0,001	0,186 0,167	0,079 0,066	0,266 0,234	41,1	8,5	36,6
A 21	0,002 0,001	0,205 0,203	0,065 0,064	0,272 0,268	47,9	7,8	34,1
BAR BN 80, 0		0,123	0,025	0,148	53,3	8,4	41,6
RK 26 0		0,132	0,023	0,155			
Bar BN 80, V23	0 0	0,151 0,108	0,026 0,031	0,177 0,139	50,0	8,6	42,8
D10-79	0,001 0,001	0,231 0,221	0,075 0,075	0,307 0,297	0,8	8,5	40,9
JN 404	0 0	0,032 0,042	0,015 0,013	0,047 0,055	< 0,1	9,0	43,5
Jet Neuf	0,001 0,001	0,295 0,305	0,069 0,062	0,365 0,368	0,5	8,4	41,5
MOM BN 73	0,001 0,001	0,143 0,178	0,034 0,041	0,177 0,220	43,2	9,0	41,8
R 33	0 0	0,112 0,143	0,061 0,071	0,173 0,214	< 0,1	8,2	43,2

1) op basis vetvrije stof

2) op oliebasis

3) op oorspronkelijk monster

Tabel 8

Bepaling ITC m.b.v. GC

RIKILTnummer	% ITC in de vetvrije droge stof
19356	0,390 - 0,391
19383	0,389 - 0,386
19537	0,393 - 0,388
19823	0,391 - 0,385
19842	0,369 - 0,365
19978	0,374 - 0,378
20202	0,358 - 0,359
20380	0,398 - 0,398
20468	0,395 - 0,399
20487	0,398 - 0,404

Tabel 9

Monsters kool/raapzaad voor ITC/VT0

Namen en land van herkomst

nr.	Ras	typenr.	Land van herkomst
1	Jet Neuf	S 1.026	Frankrijk
2	Buko (rapa)	517	BRD
3	Perko (rapa)	668	BRD
4	D 10/79	S 030	BRD
5	Jet Neuf 332	S 22.032	Frankrijk
6	Jet Neuf 404	S 033	Frankrijk
7	Miranda	801	BRD
8	D 1/81	802	BRD
9	Texi (rapa)	704	BRD
10	Noko (rapa)	703	BRD
11	D 10/79 oogst '82		BRD
12	Jet Neuf oogst '82	332	Frankrijk
13	Jet Neuf oogst '82	404	Frankrijk
14	Belinda oogst '82		BRD
15	Jet Neuf		Frankrijk
16	Belinda	S 030	BRD

Tabel 10

Vergelijking ITC methode met gecombineerde methode

Monsternummer	methode a		methode b	
zie tabel 9	ITC	Glucosinolaat	ITC	Glucosinolaat
1	0,287	0,901	0,300	0,942
2	0,353	1,108	0,311	0,977
3	0,480	1,507	0,318	0,999
4	0,240	0,754	0,156	0,490
5	0,040	0,126	0,015	0,047
6	0,025	0,079	0,013	0,041
7	0,294	0,923	0,211	0,663
8	0,198	0,622	0,129	0,405
9	0,522	1,639	0,384	1,206
10	0,553	1,736	0,312	0,980
11	0,399	1,253	0,269	0,845
12	0,045	0,141	0,015	0,047
13	0,042	0,132	0,015	0,047
14	0,390	1,225	0,250	0,785
15	0,423	1,328	0,280	0,879
16	0,190	0,597	0,049	0,154

Resultaat in % op vetvrije droge stof

methode a = normale ITC methode

methode b = gecombineerde methode

glucosinolaat = $(4,0 \times \text{allyl} + 3,1 \times \text{butenyl} + 2,6 \times \text{pentenyl}) \times 0,1$

Tabel 11

Vergelijking VTO methode (HPLC) met gecombineerde methode

Monsternummer zie tabel 9	methode a		methode b	
	VTO	Glucosinolaat	VTO	Glucosinolaat
1	0,960	2,755	0,750	2,153
2	0,160	0,459	0,090	0,258
3	0,042	0,121	0,014	0,040
4	0,690	1,980	0,460	1,320
5	0,019	0,055	0,024	0,069
6	0,015	0,043	0,018	0,052
7	0,600	1,722	0,390	1,119
8	0,410	1,177	0,180	0,517
9	0,250	0,718	0,240	0,689
10	0,022	0,063	0,020	0,057
11	0,830	2,382	0,680	1,952
12	0,034	0,098	0,015	0,043
13	0,034	0,098	0,033	0,095
14	0,830	2,382	0,650	1,866
15	0,900	2,583	0,680	1,952
16	0,190	0,545	0,082	0,235

Resultaten in % op vetvrije droge stof

methode a = normale VTO methode

methode b = gecombineerde methode

Glucosinolaat = VTO x 2,87

Tabel 12

Bepaling glucosinolaat via het glucosegehalte

Monster nr	% glucose		Δ	% glucosinolaat		
	monster met enzym	monster zon- der enzym		via glucose	via ITC + VT0*	
1	3,851	3,628	0,223	0,453		3,656
2	2,677	2,896	1,002* - 0,219	- 0,445	3,400**	1,567
3	3,187	3,027	0,160	0,325		1,628
4	3,305	3,179	0,126	0,256		2,734
5	1,555	1,632	0,779** - 0,077	- 0,156	1,575**	0,181
6	1,617	1,657	- 0,040	- 0,081		0,122
7	3,482	3,170	0,312	0,633		2,645
8	3,472	2,151	1,321	2,682		1,799
9	2,285	2,081	0,204	0,414		2,357
10	3,151	2,940	0,211	0,428		1,799
11	3,655	1,761	1,894	3,845		3,635
12	1,556	1,530	0,026	0,053		0,239
13	1,532	1,539	- 0,007	- 0,014		0,230
14	3,573	3,371	0,202	0,410		3,607
15	3,762	3,562	0,200	0,406		3,911
16	3,378	3,254	0,124	0,252		1,142

* Som van glucosinolaat verkregen door middel van de bepaling van ITC en VT0 volgens de interne voorschriften (Tabel 10 + 11, methode a).

** Blanco bij lagere pH bepaald

glucosinolaat = Δ glucose x 2,03

Het enzym bevatte 4,1% glucose

Revised November 1980

THE DETERMINATION OF VINYLOXAZOLIDINE-THIONE

1. Purpose and Scope

This method describes a gas-liquid chromatographic and a high performance liquid chromatographic procedure for the determination of vinyloxazolidine-thione (VOT) in animal feedingstuffs. *The lower limit of determination is of 200 mg/kg.*

2. Principle

The sample is submitted to an enzymatic treatment which liberates 2-hydroxy-3-butenyl isothiocyanate. This compound is transformed by a non enzymatic cyclization to VOT which is determined by gas-liquid chromatography or by high performance liquid chromatography.

3. Reagents

- 3.1 Light petroleum, boiling range 40-60°C and a bromine value less than 1.
- 3.2 Chloroform.
- 3.3 Citric acid solution: Dissolve 2.10 g of citric acid monohydrate in water and dilute to 100 ml.
- 3.4 Disodium hydrogen phosphate solution: dissolve 7.16 g of disodium hydrogen phosphate dodecahydrate in water and dilute to 100 ml with water.
- 3.5 Buffer solution, pH 7.0: mix 82.4 ml of disodium hydrogen phosphate solution (3.4) with 17.6 ml of citric acid solution (3.3).
- 3.6 White mustard (*Sinapis alba*). Whole seeds not more than 2 years old. Before use grind finely and remove oil and fat by cold extraction with light petroleum. The prepared ground mustard must contain active thioglucosidase (myrosinase) and not more than 500 mg/kg VOT.
- 3.7 Standard substance: pure vinyloxazolidine-thione.
- 3.8 Standard solution: weigh to the nearest 0.1 mg, 25 mg of pure vinoxazolidine-thione (3.7). Dissolve in chloroform (3.2) in a 50 ml graduated flask, make up to volume with the same solvent and mix. 1 ml of this solution contains 500 ug of VOT.

4. Apparatus

- 4.1 Laboratory mill or grinder.
- 4.2 Water bath controlled at 45°C.
- 4.3 Centrifuge tubes, capacity 100 ml, with efficient stoppers.
- 4.4 Gas chromatograph suitable for on-column injection fitted with a flame ionization detector.

The following conditions are offered for guidance:

- 4.4.1 Column: glass internal diameter 2-6 mm, and length 1.5-2.5 m.
- 4.4.2 Support: acid washed and silanized
(eg Gas Chrom Q or Diatomite CLQ). Mesh sizes of 80-100
(150-190 microns) and 100-120 (125-150 microns) are suitable.
- 4.4.3 Stationary phase: 5% OV 17
- 4.4.4 Column temperature: A temperature of 160 to 175°C is
recommended.
- 4.4.5 Injector - direct on-column injection is recommended.
- 4.4.6 Detector - this should be maintained at least 20°C above the
temperature of the column.
- 4.4.7 Carrier gas - nitrogen, flow rate of 30 ml min⁻¹.
- 4.5 High performance liquid chromatograph system
 - 4.5.1 Column: stainless steel, internal diameter 4.6 mm and
length 15 cm.
 - 4.5.2 Column packing material: Silica, average particle size 5 µm.
(eg Partisil 5, Lichrosorb SI 60 or Spherisorb 5).
 - 4.5.3 HPLC mobile phase: 2,2,4-Trimethylpentane/Ethanol 4:1,
delivered at a flow-rate of 1 ml min⁻¹.
 - 4.5.4 Detector: suitable ultraviolet absorptiometer operating in the
region of 245 nm.

5. Procedure

5.1 Preparation of the sample

Grind a sample portion so that it passes through a 1 mm sieve without residue. This operation should be carried out as rapidly as possible and precautions taken to avoid the generation of excessive heat. Analyse the ground sample without further delay.

5.2 Preparation of extracts

Weigh to the nearest 0.005 g, approximately 2.0 g of the prepared sample (5.1) and transfer to a centrifuge tube (4.3). Samples which contain more than 5% of crude oil should be defatted by adding 25 ml of light petroleum (3.1), mixing and shaking for 2 - 3 minutes. Allow to settle, centrifuge and decant the supernatant layer. Add a further portion of 25 ml of light petroleum and mix, shake and centrifuge as before. Decant the supernatant layer and remove the last traces of solvent in a current of air until the test portion is dry and friable.

Add 15.0 ml of buffer solution (3.5) and 0.20 g of white mustard (3.6) accurately weighed to the nearest 0.01 g. Stopper the centrifuge tube

Securely and shake by hand until the solid matter is dispersed. Transfer the tube to a water bath maintained at 45°C (4.2) and leave to stand for 90 minutes. Remove the tube from the bath and allow to cool. Add by pipette 40.0 ml of chloroform (3.2) and shake the stoppered tube vigorously by hand for two minutes. Centrifuge until the separated layers are clear. Remove part of the chloroform layer to a dry stoppered tube and retain for the chromatography which should be carried out without unnecessary delay.

5.3 Determination

5.3.1 By Gas Chromatography

Inject 5.0 µl of extract obtained in (5.2) into the gas chromatograph and measure the height of the VOT peak. Determine the concentration of VOT (µg per ml) in the extract by reference to the calibration curve (5.4.1).

5.3.2 By High Performance Liquid Chromatography

Inject 4.0 µl of extract obtained in (5.2) onto the HPLC column and measure the height of the VOT peak. Determine the concentration of VOT (µg per ml) in the extract by reference to the calibration curve (5.4.2).

5.4 Calibration curve

5.4.1 By Gas Chromatography

Into a series of 25 ml graduated flasks add by pipette 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 ml of VOT standard solution (3.8) and make up to the mark with chloroform (3.2). These solutions contain respectively 20.0, 40.0, 80.0, 120.0 and 160.0 µg of VOT per ml.

Inject 5.0 µl of each standard into the gas chromatograph and measure the heights of the VOT peaks. Plot a graph of peak height against concentration of VOT (µg per ml) in the standard solutions.

5.4.2 By High Performance Liquid Chromatography

Prepare a series of VOT standards as in (5.4.1) and inject 4.0 µl of each solution onto the HPLC column. Measure the heights of the VOT peaks and plot a graph of peak height against concentration of VOT (µg per ml) in the standard solutions.

5.5 Blank test

Carry out a blank test using the procedure described in (5.2) and omitting only the sample. Allow for this in the calculation of the results.

6. Calculations

The VOT content of the feed in mg/kg is given by the formula:

$$\frac{C \times 40}{W}$$

where C = concentration of VOT in ug per ml as determined from the calibration graph

W = weight of sample in grams.

Notes

1. An alternative stationary phase for gas chromatography is EGSS-X. However some feeds gave interfering peaks on this column under the conditions tested.

2. Using the following gas chromatographic columns at 165°C:

column 1: 5% OV.17 on Diatomite CLQ 80-100 mesh

column 2: 1% EGSS-X on Diatomite CLQ 80-100 mesh

the retention times of VOT were found to be:

column 1: 9.0 min

column 2: 8.0 min.

3. Using the following HPLC column:

Lichrosorb SI 60 the retention time of VOT was found to be 7.5 min.

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. 71 D 142

1e oplage (1983-02-16)

OLIEZADEN EN OLIEZAAD RESIDUEN - BEPALING VAN VINYL-THIONE-OXAZOLIDINE
(VTO) MET BEHULP VAN HPLC

Verzendlijst: bibliotheek (5x), sektorhoofd, afd. Normalisatie, afd.
Akkerbouw (4x).

Oliezaden en oliezaad residuen - Bepaling van vinyl-thione-oxazolidine (VTO)

1. Toepassingsgebied

Deze methode beschrijft de bepaling van vinyl-thione-oxazolidine (VTO) gevormd door enzymatische hydrolyse van glucosinaten in oliezaden, oliezaadschroten en diervoeders. De methode is bruikbaar voor het bepalen van gehalten van minimaal 10 mg/kg.

Aanwezige vrije VTO wordt met deze methode meebepaald.

2. Referentiemethoden

ISO 659 Oilseeds - Determination of hexane extract (or light petroleum extract), called "oil content".

ISO 664 Oilseeds - Reduction of contract samples to analysis samples.

ISO 734 Oilseed residues - Determination of hexane extract (or light petroleum extract), called "oil content".

3. Principe

Na het verwijderen van de olie of vetten (ontvetten) van het oliezaad of het oliezaadschroot, enzymatische hydrolyse van de glucosinaten en extractie van het VTO met chloroform wordt het VTO bepaald met behulp van hogedrukvlloeistofchromatografie.

4. Reagentia

Alle reagentia dienen van p.a. kwaliteit te zijn. Onder water wordt verstaan gedestilleerd water.

4.1 Chloroform.

4.2 n-Hexaan of als dit ontbreekt petroleumether (kooktraject 40 tot 60°C).

4.3 Fosfaatbufferoplossing pH 7, in de handel verkrijgbaar, of bijvoorbeeld een oplossing als volgt bereid:

Schenk 35,3 ml van een 0,1 M/l citroenzuur ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) oplossing (21,01 g/l) in een maatkolf van 200 ml en vul aan met een 0,2 M/l oplossing van dinatriumhydrogeenorthofosfaatdihydraat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (35,61 g/l). Meng, controleer de pH en corrigeer indien nodig door toevoeging van extra citroenzuur danwel het dinatriumhydrogeenfosfaat.

4.4 Enzym, bereid uit wit mosterdzaad (*sinapis alba* L).

Maal kiemkrachtige witte mosterdzaden zodat tenminste 80% een zeef van 280 μm passeert.

Verwijder de olie of het vet met behulp van een koude extractie met hexaan (4.2). Voer de extractie zo uit dat niet meer dan 2% olie in het produkt overblijft en zodanig dat de temperatuur van de zaden niet boven de 30°C komt.

Verwijder resten oplosmiddel bij kamertemperatuur, bij voorkeur met behulp van een zachte luchtstroom.

Bewaar het aldus bereide enzymmonster bij 4°C in een hermetisch gesloten glazen fles.

Onder deze omstandigheden is de houdbaarheid 6 weken, maar het verdient de voorkeur om het enzymmonster vers te bereiden.

Er dient een blanco bepaling uitgevoerd te worden daar het enzym ook VTO bevat. Dit gehalte mag niet meer zijn dan 500 mg/kg.

4.5 VTO standaardoplossing

Los op 20,00 mg VTO in chloroform en vul aan tot 200 ml; bewaar bij 4°C.

4.6 Iso-octaan.

4.7 Ethanol.

5. Apparatuur

Gebruikelijke laboratoriumbenodigdheden alsmede:

5.1 Apparatuur voor de monstervoorbereiding.

5.1.1 Zeef met maaswijdte 280 μm .

5.1.2 Soxhletapparatuur om olie en vet te extraheren volgens de methode beschreven in ISO 659 of een schudkogelmolen (Prolabo) zoals beschreven in ISO 734.

5.1.3 Droogoven instelbaar op $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.1.4 Waterbad 45°C .

5.2 Apparatuur voor de bepaling van VT0.

5.2.1 Hogedrukvloei-stofchromatograaf (b.v. Waters 6000 A).

5.2.2 Sampleloop van 10 μl .

5.2.3 Kolom: lengte 15 cm, inwendige diameter 4,6 mm gevuld met partisol 5 μm + voorkolom.

Flow: 1,0 ml/min (\pm 550 PSI).

5.2.4 Eluens: iso-octaan/ethanol 4/1 (v/v).

5.2.5 Detectie: UV spektrofotometer (b.v. vari-chrom VUV-10) 245 nm. Absorbance Range 0,05.

5.2.6 Thermostaat 30°C .

6. Werkwijze

6.1 Voorbereiden van het analysemonster.

6.1.1 Oliezaden

Neem, na verkleinen van het laboratoriummonster volgens ISO 664, ca. 10 g van het monster en ontvet het volgens de methode in ISO 659.

Maal, na het verwijderen van het oplosmiddel, zodat tenminste 80% van de korrels de zeef passeert.

6.1.2 Oliezaadschroten

Ontvet 10 g van het oliezaadschroot door middel van de procedure beschreven in ISO 734.

Na het verwijderen van het oplosmiddel, indien nodig malen zodat tenminste 80% van de korrels de zeef passeert.

6.2 IJklijn

Pipetteer uit de standaardoplossing respectievelijk 1, 3, 5, 10 en 15 ml in een maatkolf van 200 ml, vul aan met chloroform en meng.

Analyseer deze standaardreeks onder de omstandigheden zoals genoemd in 5.2. Zet de gevonden piekhoogten uit tegen de corresponderende $\mu\text{g VT0/ml}$ en trek een rechte lijn door de meetpunten.

6.3 Werkwijze

Weeg af 2 g van het analysemonster tot op 1 mg nauwkeurig in een erlenmeyer van 100 ml voorzien van slijpstuk en stop. Voeg toe 15,0 ml bufferoplossing en 0,2 g van het enzymmonster (op 1 mg nauwkeurig). Sluit de kolf en schud met de hand tot al het vaste materiaal gedispergeerd is. Plaats de kolf gedurende $1\frac{1}{2}$ uur in een waterbad van 45°C . Koel af, voeg toe 50,0 ml chloroform en schud de gesloten kolf krachtig met de hand gedurende twee minuten. Breng de oplossing over in een centrifugebuis en centrifugeer 10 min (4000 rpm). Zuig de bovenstaande waterlaag af en filtreer de chloroform over een $0,2\ \mu\text{m}$ filter (b.v. Acrodisc-Cr). Het filtraat is nu, na eventueel verdunnen, geschikt voor de HPLC analyse. Injekteer $10\ \mu\text{l}$ en meet de piekhoogte van de VT0 piek.

7. Berekening van de resultaten

7.1 VT0-gehalte

$$\text{piekhoogte VT0 (monster + blanco enzym)} - \frac{A \times B}{0,2 \times F} = \text{piekhoogte VT0 monster}$$

waarbij

A = toegevoegd enzym in grammen

B = piekhoogte enzym per 0,2 gram

F = eventuele verdunningsfactor.

Bereken met behulp van de ijklijn de corresponderende $\mu\text{g/ml}$.

Het gehalte in mg/kg vetvrije monster is equivalent met:

$$\frac{E \times 50}{G} \times F$$

waarbij

E = μg VTO/ml chloroform verkregen uit de ijklijn

G = afgewogen monster in grammen

F = eventuele verdunningsfactor.

7.2 Het resultaat wordt uitgedrukt op de vetvrije droge stof, danwel het oorspronkelijk monster.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse

Samenstellers/Medewerkers: M.L. Essers, L.M.H. Frijns

Oilseeds and oilseed residues — Determination of isothiocyanates and vinyl thiooxazolidone

1 Scope and field of application

This International Standard specifies a method for the determination of the isothiocyanates (ITC) and vinyl thiooxazolidone (VTO) produced by the enzymic hydrolysis of glucosinolates in seeds and oilseed residues of colza and rapeseed.

Under the operating conditions described, the method does not allow determination of free isothiocyanates and free vinyl thiooxazolidone.

It also gives, in an annex, a method of determining isothiocyanates by argentimetry which may be substituted for the gas chromatographic method, by agreement between the parties. This method is not applicable, however, to oilseeds or oilseed residues having low glucosinates contents.

2 References

ISO 659, *Oilseeds — Determination of hexane extract (or light petroleum extract), called "oil content"*.

ISO 664, *Oilseeds — Reduction of contract samples to analysis samples*.

ISO 734, *Oilseed residues — Determination of hexane extract (or light petroleum extract), called "oil content"*.

3 Principle

After removal of the fats and oil (de-fatting) if necessary, and drying of the oilseed or oilseed residue, enzymatic hydrolysis of the glucosinolates, extraction of isothiocyanates with dichloromethane and of vinyl thiooxazolidone with diethyl ether.

Determination of the ITC by gas chromatography and of the VTO by ultraviolet spectrophotometry.

4 Reagents

The reagents shall be of recognized analytical quality and the water used shall be distilled water or water of at least equivalent purity.

4.1 Reagents for determination of ITC

4.1.1 Dichloromethane, or, failing this, chloroform.

4.1.2 *n*-Hexane, or, failing this, light petroleum (boiling range 40 to 60 °C).

4.1.3 Buffer solution of pH 7, commercially available, or, for example, a solution prepared as follows :

Pour 35,3 ml of 0,1 mol/l citric acid ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) solution (21,01 g/l solution) into a 200 ml one-mark volumetric flask and make up to the mark with a 0,2 mol/l solution of disodium hydrogen orthophosphate dihydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (35,61 g/l solution). Check the pH and, if necessary, adjust.

4.1.4 Enzyme source, prepared from white mustard seeds (*Sinapis alba* L.).¹⁾

Finely grind the white mustard seeds so that at least 80 % will pass through a sieve of aperture size 280 µm.

Remove the oil and fat from the grindings using cold hexane or, failing this, cold light petroleum (4.1.2), carrying out the extraction using an apparatus which will permit extraction until not more than 2 % of oil remains in the product and without the temperature exceeding 30 °C, for example a double-walled Soxhlet apparatus, or by carrying out extractions by grinding with hexane in a microgrinder cooled by running water. Remove traces of solvent at ambient temperature, preferably using a slight current of air.

Store the enzyme source thus obtained at 4 °C in a hermetically sealed glass bottle. In these conditions, it can be kept for about 6 weeks, but it is preferable to use a freshly prepared enzyme source.

1) Use seed in which more than 85 % of the grains should germinate in less than 72 h.

It is recommended that a blank test be performed to ensure that the enzyme source does not contain ITC.

4.1.5 Butyl isothiocyanate, standard solution.

Prepare a 0,500 g/l solution of butyl isothiocyanate in the dichloromethane or chloroform (4.1.1). Store at 4 °C.

This solution may be diluted if necessary, according to the expected isothiocyanates content of the sample.

4.1.6 Gases for gas chromatography.

Carrier gas : carefully dried nitrogen containing less than 10 mg of oxygen per kilogram.

Auxiliary gases : hydrogen and air.

4.2 Reagents for the determination of VTO

4.2.1 Diethyl ether, spectrophotometric quality.

4.2.2 Anti-foaming agent, for example octan-2-ol.

4.2.3 Buffer solution, of pH 7 (see 4.1.3).

4.2.4 Enzyme source (see 4.1.4).

5 Apparatus

Usual laboratory equipment and in particular

5.1 Apparatus for preparing the test sample and drying the test portion

5.1.1 Sieve, of aperture size 280 µm.

5.1.2 Apparatus for the extraction of fat and oil by the method specified in ISO 659 or ISO 734, if necessary.

5.1.3 Grinder.

5.1.4 Desiccator.

5.1.5 Analytical balance.

5.1.6 Electric oven, capable of being controlled at 103 ± 2 °C.

5.1.7 Conical flask, of capacity 25 ml.

5.2 Apparatus for the determination of ITC

5.2.1 Chromatograph, with a flame ionization detector and a recorder, comprising, for example, a column of length 2 m, external diameter 3,2 mm and internal diameter 2 mm, filled

with 10 % diethylene glycol succinate (DEGS) on GAS/CHROMOSORB P 150 to 180 µm (80 to 100 mesh) (treated with hexamethyldisilazane).

5.2.2 Stirrer/shaker system, for conical flasks, or a magnetic stirrer.

5.2.3 Microsyringe, of capacity 1 µl.

5.2.4 Pipettes, of capacities 5 ml to 10 ml.

5.3 Apparatus for the determination of VTO

5.3.1 Spectrophotometer, preferably with a recorder, suitable for measurements in the ultraviolet.

5.3.2 Stirrer/shaker system, for conical flasks, or a magnetic stirrer.

5.3.3 Conical flasks, of capacities 100 and 200 ml.

5.3.4 One-mark volumetric flasks, of capacities 25 and 100 ml.

5.3.5 Beaker, of capacity 50 ml.

5.3.6 Separating funnel, of capacity 50 ml.

5.3.7 Pipette, of capacity 1 ml.

6 Procedure

6.1 Preparation of the test sample

6.1.1 Oilseeds

After reducing the laboratory sample in accordance with ISO 664, take about 10 g of the oilseed and de-fat it using the procedure specified in ISO 659. After removing the solvent, grind if necessary, so that at least 80 % of the grindings obtained pass through the sieve (5.1.1).

6.1.2 Oilseed residues

As de-fatting is not necessary for oil contents below 5 %, use the oilseed residues as received after grinding, if necessary, so that at least 80 % of the grindings obtained pass through the sieve (5.1.1).

As results are expressed relative to the de-fatted sample, it is necessary to perform a parallel determination of the oil content of the oilseed residue, using the method described in ISO 734 or any other method.

However, if the oil content is greater than 5 % (pressed oilseed residues), carry out de-fatting of 10 g of oilseed residue using the procedure specified in ISO 734. After elimination of the solvent, grind, if necessary.

6.2 Determination of α ITC

6.2.1 Test portion

Transfer approximately 2.2 g of the test sample (6.1) to a 25 ml conical flask (5.1.7), which has been previously dried and weighed to the nearest 1 mg. Place in the oven (5.1.6), controlled at $103 \pm 2^\circ\text{C}$, for at least 8 h, and allow to cool in the desiccator (5.1.4) to room temperature.

NOTE — Simultaneously, dry the test portion to be used for the determination of VTO in the beaker if this analysis has been requested (see 6.3.1).

Weigh the conical flask to the nearest 1 mg, and determine the mass of the de-fatted, if necessary, and dried test portion (about 2 g).

6.2.2 Determination

Add to the test portion, 5 ml of the buffer solution (4.1.3), 0.25 g of the enzyme source (4.1.4) and 10 ml, using the pipette (5.2.4), of the standard butyl isothiocyanate solution (4.1.5) (using a more dilute solution, if necessary).

Shake for 2 h using the stirrer/shaker system or the magnetic stirrer (5.2.2). Allow to separate, or centrifuge if necessary.

Using the microsyringe (5.2.3), take 1 μl of the dichloromethane or chloroform phase, avoiding taking any particles in suspension, and inject this into the chromatograph (5.2.1) controlled, for example, as follows:

temperature of the injector : 135°C

temperature of the column : 110°C

temperature of the detector : 130°C

pressure or flow rate of the carrier gas : 80 kPa* or flow rate of 20 to 30 ml/min.

The order of elution is as follows:

allyl isothiocyanate,

butyl isothiocyanate,

butenyl isothiocyanate,

pentenyl isothiocyanate.

NOTES

1 For information, if using diethylene glycol succinate (DEGS) as the stationary phase, the retention times relative to butyl isothiocyanate are as follows:

allyl isothiocyanate : 0.70

butenyl isothiocyanate : 1.45

pentenyl isothiocyanate : 2.45

2 As the solution injected is very corrosive, clean the microsyringe immediately after use with a solvent.

6.3 Determination of VTO

6.3.1 Test portion

Transfer approximately 2.2 g of the test sample (6.1) to a 50 ml beaker (5.3.5), which has been previously dried and weighed to the nearest 1 mg. Place in the oven (5.1.6), controlled at $103 \pm 2^\circ\text{C}$, for at least 8 h, and allow to cool in the desiccator (5.1.4) to room temperature.

Weigh the beaker to the nearest 1 mg, and determine the mass of the de-fatted, if necessary, and dried test portion (about 2 g).

6.3.2 Determination

Quantitatively transfer the test portion into a 200 ml conical flask (5.3.3) and add 70 ml of boiling buffer solution (4.2.3), using some of which to rinse the beaker. Allow to cool to about 30°C , then add 0.50 g of the enzyme source (4.2.4) and a few drops of the anti-foaming agent (4.2.2). Shake for 2 h using the stirrer/shaker system or the magnetic stirrer (5.3.2).

Immediately transfer quantitatively to a 100 ml one mark volumetric flask (5.3.4), rinsing with water, and make up to the mark with water. Filter and collect the filtrate in a 100 ml conical flask (5.3.3). Shake gently for 30 s and, by means of the pipette (5.3.7), take 1 ml and place it in the 50 ml separating funnel (5.3.6). Carry out two extractions of the VTO using 10 ml of the diethyl ether (4.2.1) each time. Collect the ether layers in a 25 ml one-mark volumetric flask (5.3.4), and make up to the mark with diethyl ether.

Determine the absorption curve from 220 to 280 nm and subtract the absorbance read at 280 nm from that read at the maximum absorbance, which occurs at about 250 nm, in order to obtain the absorbance of the test portion.

If the absorbance values obtained are beyond the limits of the instrument, dilute as necessary with diethyl ether.

6.3.3 Blank test

Carry out a blank test under the same conditions, omitting the test portion in order to determine the absorbance due to the enzyme source.

7 Expression of results

NOTE — For animal feeding stuffs, the results are generally expressed relative to the product as received. Thus, if such a manner of expression of results is required, make the necessary corrections to take into account the water and oil contents.

7.1 ITC content

The ITC content, expressed in milligrams per gram of dry matter of the de-fatted sample, is equal to

$$\frac{m_a}{115,19 \times S_e \times m} (99,15 \times S_b + 113,18 \times S_b + 0,9 \times 127,21 \times S_p)$$

where

m is the mass, in grams, of the de-fatted and dried test portion (6.2.1);

m_a is the mass, in milligrams, of butyl isothiocyanate contained in 10 ml of solution (usually 5 mg);

S_a is the area of the peak corresponding to butyl isothiocyanate;

S_b is the area of the peak corresponding to allyl isothiocyanate;

S_b is the area of the peak corresponding to butenyl isothiocyanate;

S_p is the area of the peak corresponding to pentenyl isothiocyanate.

OTE — The value 0,9 is the response coefficient of pentenyl isothiocyanate.

7.2 VTO content

The VTO content, expressed in milligrams per gram of dry matter of the de-fatted sample, is equal to

$$(A_E - A_B) C_p \times 25 \times 100 \times \frac{1}{m} \times 10^{-3}$$

where

A_E is the absorbance of the test solution (6.3.2);

A_B is the absorbance of the blank test solution (6.3.3);

C_p is a coefficient of proportionality, equal to 8,20;

m is the mass, in grams, of the test portion (6.3.1).

A simplified formula may thus be derived

$$\frac{20,5 \times (A_E - A_B)}{m} = \frac{C}{M} \cdot K$$

Take into account any dilution of the test solution.

8 Test report

The test report shall show the method used and the results obtained. It shall also mention any operating details not specified in this International Standard, or regarded as optional, together with any incidents likely to have affected the results.

The test report shall give all the information necessary for the complete identification of the sample.

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. 71 D 143

1e oplage (1983-06-01)

OLIEZADEN EN OLIEZAAD RESIDUEN - BEPALING VAN VINYL-THIONE-OXAZOLIDINE
(VTO) MET BEHULP VAN SPEKTROFOTOMETRIE

Verzendlijst: bibliotheek (5x), sektorhoofd, afd. Normalisatie, afd.
Koolhydraat- Vetschemie (4x).

Oliezaden en oliezaad residuen - Bepaling van vinyl-thione-oxazolidine (VTO) met behulp van spektrofotometrie

1. Toepassingsgebied

Deze methode beschrijft de bepaling van vinyl-thione-oxazolidine (VTO) gevormd door enzymatische hydrolyse van glucosinaten in oliezaden, oliezaadschroten en diervoeders. De methode is bruikbaar voor het bepalen van hoge gehalten vanaf ca. 500 mg/kg (0,05%). Aanwezige vrije VTO wordt met deze methode meebepaald.

2. Referentiemethoden

ISO 659 Oilseeds - Determination of hexane extract (or light petroleum extract), called "oil content".

ISO 664 Oilseeds - Reduction of contract samples to analysis samples.

ISO 734 Oilseed residues - Determination of hexane extract (or light petroleum extract), called "oil content".

ISO/DIS 5504 Oilseeds and oilseed residues - Determination of isothiocyanates and vinyl-thiooxazolidone.

3. Principe

Na het verwijderen van de olie of vetten (ontvetten) van het oliezaad of het oliezaadschroot, enzymatische hydrolyse van de glucosinaten en extractie van het VTO met di-ethyl-ether wordt het VTO spektrofotometrisch bepaald.

4. Reagentia

Alle reagentia dienen van p.a. kwaliteit te zijn. Onder water wordt verstaan gedestilleerd water.

4.1 Di-ethyl-ether, spektrofotometrische kwaliteit.

4.2 n-Hexaan of als dit ontbreekt petroleumether (kooktraject 40 tot 60°C).

4.3 Fosfaatbufferoplossing pH 7, in de handel verkrijgbaar, of bijvoorbeeld een oplossing als volgt bereid:

Schenk 35,3 ml van een 0,1 M/l citroenzuur ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) oplossing (21,01 g/l) in een maatkolf van 200 ml en vul aan met een 0,2 M/l oplossing van dinatriumhydrogeenorthofosfaatdihydraat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (35,61 g/l). Meng, controleer de pH en corrigeer indien nodig door toevoeging van extra citroenzuur danwel het dinatriumhydrogeenfosfaat.

4.4 Enzym, bereid uit wit mosterdzaad (*sinapis alba* L).

Maal kiemkrachtige witte mosterdzaden zodat tenminste 80% een zeef van 280 μm passeert.

Verwijder de olie of het vet met behulp van een koude extractie met hexaan (4.2). Voer de extractie zo uit dat niet meer dan 2% olie in het produkt overblijft en zodanig dat de temperatuur van de zaden niet boven de 30°C komt.

Verwijder resten oplosmiddel bij kamertemperatuur, bij voorkeur met behulp van een zachte luchtstroom.

Bewaar het aldus bereide enzymmonster bij 4°C in een hermetisch gesloten glazen fles.

Onder deze omstandigheden is de houdbaarheid 6 weken, maar het verdient de voorkeur om het enzymmonster vers te bereiden.

Er dient een blanco bepaling uitgevoerd te worden daar het enzym ook VTO bevat.

4.5 Anti-schuimmiddel, bijvoorbeeld octanol-2.

5. Apparatuur

Gebruikelijke laboratoriumbenodigdheden alsmede:

5.1 Apparatuur voor de monstervoorbereiding.

5.1.1 Zeef met maaswijdte 280 μm .

5.1.2 Soxhletapparatuur om olie en vet te extraheren volgens de methode beschreven in ISO 659 of een schudkogelmolen (Prolabo) zoals beschreven in ISO 734.

5.1.3 Droogoven instelbaar op $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.1.4 Schudapparaat, geschikt voor erlenmeyers, of een magnetische roerder.

5.1.5 Scheitrechter van 50 ml.

5.2 Apparatuur voor de bepaling van VT0.

5.2.1 Spektrofotometer, geschikt voor metingen in het UV gebied (220-280 nm), gekoppeld aan een recorder.

6. Werkwijze

6.1 Voorbereiden van het analysemonster.

6.1.1 Oliezaden

Neem, na verkleinen van het laboratoriummonster volgens ISO 664, ca. 10 g van het monster en ontvet het volgens de methode in ISO 659. Maal, na het verwijderen van het oplosmiddel, zodat tenminste 80% van de korrels de zeef passeert.

6.1.2 Oliezaadschroten

Ontvet 10 g van het oliezaadschroot door middel van de procedure beschreven in ISO 734.

Na het verwijderen van het oplosmiddel, indien nodig, malen zodat tenminste 80% van de korrels de zeef passeert.

6.2 Werkwijze

Weeg af 2 g van het analysemonster tot op 1 mg nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg toe 70 ml kokende buffer. Laat afkoelen tot ongeveer 30°C , voeg toe 0,5 gram van het enzymmonster (op 10 mg nauwkeurig) en enkele druppels anti-schuim. Schud gedurende 2 uur met behulp van het schudapparaat, of de magnetische roerder.

Spoel onmiddellijk over met behulp van water in een maatkolf van 100 ml en vul aan tot 100 ml met water. Meng, filtreer en vang het filtraat op in een erlenmeyer van 100 ml.

Zwenk voorzichtig gedurende 30 sec en pipetteer 1 ml in de scheitrechter van 50 ml. Extraheer tweemaal met 10 ml di-ethyl-ether. Verzamel de etherfracties in een maatkolf van 25 ml, en vul aan tot 25 ml met di-ethyl-ether en meng.

Bepaal de extinctie-curve van 220 tot 280 nm. De maximale extinctie (bij ongeveer 250 nm) wordt verminderd met de extinctie bij 280 nm. Zijn de verkregen extincties buiten de limit van het instrument, verdun de meetoplossing dan met di-ethyl-ether.

Voer een blanco bepaling uit, zonder toevoeging van het analysemonster, om de extinctie van het enzymmengsel te bepalen.

7. Berekening van de resultaten

7.1 VTO-gehalte in mg/gr

$$\frac{(A_e - A_b) C_p \times F \times 2,5}{m}$$

waarbij:

A_e = extinctie van het analysemonster

A_b = extinctie van de blanco bepaling

C_p = coëfficiënt (empirisch bepaald) gelijk aan 8,20

m = massa analysemonster, in grammen

F = eventuele verdunningsfactor.

7.2 Het resultaat wordt uitgedrukt op de vetvrije droge stof, danwel het oorspronkelijk monster in hele getallen.

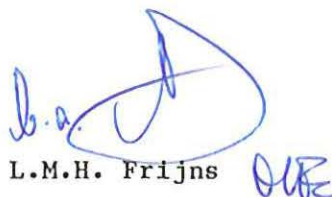
8. Herhaalbaarheid en Reproduceerbaarheid

Het verschil tussen twee bepalingen kort na elkaar uitgevoerd door dezelfde analist mag niet meer bedragen dan 0,5 mg/gr.

De interne reproduceerbaarheid wordt vermoedelijk beïnvloed door de bewaring van het monster. Het verschil tussen twee bepalingen 1-2 maanden na elkaar uitgevoerd mag niet meer bedragen dan 2 mg/gr.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse

Samenstellers/medewerkers: M.L. Essers, L.M.H. Frijns



CP wax 57CB

Butyl

Butenyl

pentenyl

allyl

Silar 9CP

Butyl

Butenyl

Pentenyl

allyl

Butyl

Butenyl

pentenyl

allyl

Silar 5CP

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. 71 D 141

(vertaalde ISO methode)*

1e oplage (1982-09-30)

OLIEZADEN EN OLIEZAAD RESIDUEN - BEPALING VAN ISOTHIOCYANATEN (ITC)

Verzendlijst: bibliotheek (5x), sektorhoofd, afd. Normalisatie, afd.
Akkerbouw (4x).

Oliezaden en oliezaad residuen - Bepaling van isothiocyانات (ITC)

1. Toepassingsgebied

Deze internationale standaard beschrijft een methode voor de bepaling van isothiocyانات (ITC) gevormd door enzymatische hydrolyse van glucosinolaten in oliezaden en oliezaadschroten of diervoeders.

Onder de beschreven omstandigheden, houdt de methode geen rekening met aanwezige vrije isothiocyانات. De methode is bruikbaar voor gehalten boven 20 mg per kg per component.

2. Referentiemethoden

ISO 659 Oilseeds - Determination of hexane extract (or light petroleum extract), called "oil content".

ISO 664 Oilseeds - Reduction of contract samples to analysis samples.

ISO 734 Oilseed residues - Determination of hexane extract (or light petroleum extract), called "oil content".

3. Principe

Na het verwijderen van de olie of vetten (ontvetten) van het oliezaad of het oliezaadschroot, enzymatische hydrolyse van de glucosinaten en extractie van de isothiocyانات met dichloormethaan worden de isothiocyانات bepaald met behulp van gaschromatografie.

4. Reagentia

Alle reagentia dienen van p.a. kwaliteit te zijn. Onder water wordt verstaan gedestilleerd water.

4.1 Reagentia voor de bepaling van isothiocyانات.

4.1.1 Dichloormethaan of als dit ontbreekt, chloroform.

4.1.2 n-Hexaan of als dit ontbreekt petroleumether (kooktraject 40 tot 60°C).

4.1.3 Fosfaatbufferoplossing pH 7, in de handel verkrijgbaar, of bijvoorbeeld een oplossing als volgt bereid:

Schenk, 35,3 ml van een 0,1 mol/l citroenzuur ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) oplossing (21,01 g/l) in een maatkolf van 200 ml en vul aan met een 0,2 mol/l oplossing van dinatriumhydrogeenorthofosfaatdihydraat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (35,61 g/l). Meng en controleer de pH en corrigeer indien nodig door toevoeging van extra citroenzuur danwel het dinatriumhydrogeenfosfaat.

4.1.4 Enzym, bereid uit wit mosterdzaad (*sinapis alba* L)¹⁾.

Maal kiemkrachtige witte mosterdzaden zodat tenminste 80% een zeef van 280 µm passeert.

Verwijder de olie of het vet met behulp van een koude extractie met hexaan (4.1.2). Voer de extractie zo uit dat niet meer dan 2% olie in het produkt overblijft en zodanig dat de temperatuur van de zaden niet boven de 30°C komt, bijvoorbeeld met een dubbelwandig soxhlet apparaat. Verwijder resten oplosmiddel bij kamertemperatuur, bij voorkeur met behulp van een zachte luchtstroom.

Bewaar het aldus bereide enzymmonster bij 4°C in een hermetisch gesloten glazen fles.

Onder deze omstandigheden is de houdbaarheid 6 weken, maar het verdient de voorkeur om het enzymmonster vers te bereiden.

Het is aan te bevelen om een blancobepaling uit te voeren om zeker te zijn dat het enzymmonster geen ITC bevat.

4.1.5 Butyl-isothiocyanaat, standaardoplossing

Los op 0,500 g butyl-isothiocyanaat in 1 liter dichloormethaan of chloroform, bewaar bij 4°C. Deze oplossing dient zonodig verdund te worden, afhankelijk van de verwachte concentratie in het monster.

4.1.6 Gassen voor de gaschromatografie

Draaggas: zorgvuldig gedroogde stikstof met minder dan 10 mg zuurstof per kilogram.

Hulpgasen: waterstof en lucht.

5. Apparatuur

Gebruikelijke laboratoriumbenodigdheden alsmede:

5.1 Apparatuur voor de monstervoorbereiding.

5.1.1 Zeef met maaswijdte 280 μm .

5.1.2 Soxhletapparatuur om olie en vet te extraheren volgens de methode beschreven in ISO 659 of ISO 734 indien noodzakelijk.

5.1.3 Slagkruismolen.

5.1.4 Droogoven instelbaar op $103 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.2 Apparatuur voor de bepaling van isothiocyanaat.

5.2.1 Gaschromatograaf met vlamionisatiedetector en een recorder, glaskolom met lengte 2 m, inw. diameter 2 mm, gevuld met 15% Silar 9 CP op chromosorb WAW 100-120.

5.2.2 Schudapparaat voor erlenmeyers of een magnetische roerder.

5.2.3 Micro injectiespuit 1 μl .

6. Werkwijze

6.1 Voorbereiden van het analysemonster.

6.1.1 Oliezaden

Neem, na verkleinen van het laboratoriummonster volgens ISO 664, ca. 10 g van het monster en ontvet het volgens de methode in ISO 659. Maal na het verwijderen van het oplosmiddel, zodat tenminste 80% van de korrels de zeef passeert (5.1.1).

6.1.2 Oliezaadschroten

Ontvet 10 g van het oliezaadschroot door middel van de procedure beschreven in ISO 734.

Na het verwijderen van het oplosmiddel, malen indien nodig, zodat tenminste 80% van de korrels de zeef passeert.

6.2 Bepaling van de isothiocyانات

6.2.1 Analysemonster

Weeg af ca. 2,2 g van het analysemonster tot op 1 mg nauwkeurig (6.1) in een erlenmeyer van 25 ml.

6.2.2 Bepaling

Voeg toe aan het analysemonster, 5 ml bufferoplossing (4.1.3), 0,25 g van het enzymmonster (4.1.4) en 10 ml gepipetteerde standaard butylisothiocyanaat (4.1.5) oplossing (gebruik eventueel een meer verdunde oplossing indien het piekoppervlak minder is dan 10% van de interne standaard).

Schud gedurende 2 uur met behulp van een schudapparaat of magneet-roerder.

Laat de vloeistof scheiden en of centrifugeer. Zuig de bovenstaande waterfase af en injecteer 1 µl van de organische fase in de gaschromatograaf.

Gaschromatografische omstandigheden:

injectietemperatuur 135°C

kolomtemperatuur 100°C

detectietemperatuur 130°C.

Draaggasdebiet 20 tot 30 ml/min.

Bij silar 9 CP als stationaire fase zijn de relatieve retentietijden ten opzichte van butylisothiocyanaat als volgt:

allylisothiocyanaat	0,61
butenylisothiocyanaat	1,18
pentenylisothiocyanaat	1,96

Noot:

1. Daar de injectievloeistof corrosiewerkend is dient de injectiespuit nagespoeld te worden met b.v. hexaan.

7. Berekening van de resultaten

7.1 Isothiocyanaat gehalte.

Het isothiocyanaat gehalte in massaprocenten vetvrij materiaal is equivalent met:

$$\frac{M_e}{S_e \times m} (1,2 S_a + 1,0 S_b + 0,9 S_p) \cdot 0,1$$

waarbij:

m = de massa in grammen van de vetvrije inweeg (6.2.1)

M_e = de massa in milligrammen van de butylisothiocyanaat in 10 ml oplossing (normaal 5 mg)

S_e = het piekoppervlak van de butylisothiocyanaatpiek

S_a = het piekoppervlak van de allylisothiocyanaatpiek

S_b = het piekoppervlak van de butenylisothiocyanaatpiek

S_p = het piekoppervlak van de pentenylisothiocyanaatpiek

7.2 Glucosinolaatgehalte op basis van ITC

Het glucosinolaatgehalte op basis van de isothiocyanaten in massaprocenten vetvrij materiaal is equivalent met:

$$\frac{M_e}{S_e \times m} (4,0 S_a + 3,1 S_b + 2,6 S_p) \cdot 0,1$$

waarbij de symbolen dezelfde betekenis hebben als bij 7.1.

7.3 Het resultaat dient uitgedrukt te worden tot op 1 decimaal nauwkeurig, met duidelijke vermelding op welke component het gehalte betrekking heeft, berekend op de vetvrije waar.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse

Samenstellers/medewerkers: T.C. Wolters, L.M.H. Frijs